

Title	Bone Morphogenetic Protein-2 Inhibits Serum Deprivation-induced Apoptosis of Neonatal Cardiac Myocytes through Activation of the Smad1 Pathway
Author(s)	和泉, 匡洋
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44390
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	和 泉 匡 洋
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 2 7 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 9 月 17 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Bone Morphogenetic Protein-2 Inhibits Serum Deprivation-induced Apoptosis of Neonatal Cardiac Myocytes through Activation of the Smad1 Pathway (Bone morphogenetic protein-2 は、Smad1 pathway を活性化し血清除去による心筋細胞のアポトーシスを抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川瀬 一郎 (副査) 教 授 吉崎 和幸 教 授 荻原 俊男

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

BMP (bone morphogenetic protein) は、異所性骨形成を誘導する物質として発見され、その後遺伝子クローニングにより構造が示され、TGF- β スーパーファミリーに属することが明らかにされた。TGF- β スーパーファミリーの作用は多岐にわたり、細胞の増殖や細胞外マトリックスの産生のみならず、発生、形態形成、免疫応答やアポトーシスにおいて重要な役割を果たしている。TGF- β スーパーファミリーは、I 型と II 型の 2 種類のセリン/スレオニンキナーゼ型レセプターを介してそのシグナルを細胞内に伝達する。そのレセプターの下流には、Smad と TAK1 (TGF- β activated kinase1) の細胞シグナル伝達分子が存在する。BMP-2 は、中胚葉分化、形態形成に重要な役割をしていることが、BMP-2 欠損マウスによって証明されている。BMP-2 欠損マウスは、胎生 9 日目までに致死となり、羊膜、漿膜の形成異常を示し、管状のままの未発達の心臓が胚体外体腔に異所的に観察された。また、ニワトリ胚において、非心臓予定中胚葉が BMP-2 刺激により心筋細胞に分化した。これらのことより、BMP-2 は心臓の発生、分化に重要であることが証明された。しかし、生後の心筋細胞における BMP-2 の役割はまだ十分には解明されていない。今回、我々は新生仔ラットの培養心筋細胞をもちいて、BMP-2 刺激によるシグナル伝達経路、標的遺伝子及び心筋細胞への作用を検討した。

【方法】

i) 新生仔ラットより摘出した心臓から、酵素法を用いて心筋細胞を分離培養した。ii) RT-PCR 法を用い、心筋細胞での BMP-2 レセプターの存在を確認した。iii) BMP-2 レセプターの下流のシグナル伝達系を調べるために、ウェスタンブロット法で Smad1、MAPK (mitogen-activated protein kinase) ファミリーの活性化を評価した。iv) 心筋細胞肥大は、細胞面積の測定と [3 H]leucine の細胞内取込みで評価した。v) 血清を除去することにより心筋細胞にアポトーシスを誘導する系を用い、ミトコンドリア内脱水素酵素活性を測定する MTS assay で心筋細胞のバイアビリティと、TUNEL assay 及び Cell Death Detection ELISA assay で、アポトーシスを評価した。vi) アポトーシス関連蛋白である bcl-2 及び bcl-xL の発現をノーザンブロット法及びウェスタンブロット法により評価した。vii) アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、心筋細胞での bcl-xL 遺伝子発現を抑制し、BMP-2 のアポトーシス抑制効果を検

討した。viii) アデノウイルスベクターシステムを用いた特異型 Smad である Smad1、抑制型 Smad である Smad6 を心筋細胞に強制発現させて、Smad pathway のアポトーシスに対する影響を検討した。

【結果】

1. 新生仔ラット心筋細胞での BMP-2 レセプターの発現

BMP receptor type I a、I b、activin receptor type I、BMP receptor type II の mRNA の発現を認めた。

2. 新生仔ラット心筋細胞での BMP-2 のシグナル伝達系

BMP-2 刺激により、15 分から 30 分をピークに、また濃度依存的に Smad1 のリン酸化を認めた。

MAPK ファミリーでは、p38 MAPK は、5 分から 1 時間後にかけてリン酸化の増強を認めたが、ERK (extracellular signal-regulated kinase) 及び JNK (c-jun amino-terminal kinase) の活性化には変化がなかった。

3. BMP-2 の心筋細胞肥大作用

BMP-2 (80 ng/ml) 刺激により、細胞面積の増大及び [³H] leucine の細胞内取込みの増加を認めるものの、その程度は leukemia inhibitory factor (LIF) (1×10³ U/ml) や norepinephrine (2 μg/ml) と比較し有意に小さかった。

4. BMP-2 の心筋細胞保護作用 (抗アポトーシス作用)

血清除去による心筋パイアビリティーの低下は、BMP-2 により濃度依存的に有意に改善し、LIF と同程度の心筋保護効果を示した。一方、線維芽細胞においては、このような保護的な効果は認めなかった。また、TUNEL assay 及び Cell Death Detection ELISA assay により、BMP-2 は、血清除去によるアポトーシスを有意に抑制し、BMP-2 の心筋保護作用は抗アポトーシス作用によるものと考えられた。

5. BMP-2 の心筋細胞抗アポトーシス作用の分子レベルでの解析

BMP2 刺激により、bcl-xL の mRNA の発現の増強を認め、蛋白レベルにおいても bcl-xL の増加を認めた。Bcl-2 の発現は変化を認めなかった。bcl-xL のアンチセンスを導入することにより、BMP-2 による bcl-xL の蛋白の発現レベルが有意に低下し、同時に BMP-2 の心筋保護効果も有意に抑制された。これらの結果より bcl-xL の誘導が BMP2 の抗アポトーシス作用に必須であることがわかった。

6. BMP-2 の心筋細胞抗アポトーシス作用にかかわるシグナル伝達系

アデノウイルスベクターシステムを用い、Smad1 を強制発現させた。興味深いことに、Smad1 の蛋白量の増加と同時に Smad1 の自己リン酸化も認めた。Smad1 を強制発現することにより、アポトーシスは有意に抑制され、BMP-2 刺激でさらなる抗アポトーシス作用を認めた。分子レベルにおける検討でも、Smad1 を強制発現することにより、bcl-xL の mRNA、蛋白量ともに有意に増加していた。さらに、抑制型の Smad6 を心筋細胞に強制発現したところ、BMP-2 刺激による Smad1 のリン酸化は抑制されたが、p38MAPK の活性化は抑制されなかった。また、Smad6 の強制発現により、BMP-2 の抗アポトーシス作用は有意に抑制された。

【総括】

今回の検討により、新生仔ラットの心筋細胞において、生後の心筋細胞にも、BMP-2 の type I レセプターである BMPR-IA、BMPR-IB、ActR-IA と type II レセプターである BMPR-II が存在し、その下流には、Smad と p38 MAPK のシグナル伝達系が存在することがわかった。血清除去によりアポトーシスを誘導する系を用いた検討により、BMP-2 刺激を加えることによりアポトーシスが抑制され心筋保護効果があることがわかった。BMP-2 の心筋保護効果を示すメカニズムの検討では、Smad シグナル伝達系が主たる pathway と考えられ、ターゲット分子として bcl-xL が重要であることが示唆された。心筋保護効果を示す液性因子としてはこれまでに、insulin growth factor-1、neuregulin、cardiotrophine-1、LIF などが報告されているが、これらはいずれも肥大を示すことが報告されている。BMP-2 は、肥大作用が少なく、心臓のリモデリングへの影響が少ないと考えられ、心筋保護を目的とした臨床への応用が期待される。現在、心筋特異的 smad1 のトランスジェニックマウスを作成中であり、それらを用い、心筋虚血や Doxorubicin 負荷に対する Smad1 の心筋保護効果を今後検討する予定である。

論文審査の結果の要旨

TGF- β スーパーファミリーに属する BMP (bone morphogenetic protein)-2 は、心臓の発生、分化に重要な分子である。しかし、生後の心筋細胞の機能維持における BMP-2 の役割はまだ十分には解明されていない。

本研究では、新生仔ラットの培養心筋細胞を用い、心筋細胞において BMP-2 のシグナル伝達系 (smad pathway、p38 MAPK pathway) が存在し、心筋保護効果 (抗アポトーシス作用) を有することを初めて報告した。そのメカニズムの検討では、Smad シグナル伝達系が主たる pathway と考えられ、ターゲット分子として bcl-xL が重要であることが示唆された。心筋保護効果を有する液性因子としてはこれまでに、insulin growth factor-1、cardiotrophine-1 などが報告されているが、これらはいずれも心筋肥大を示すことが報告されている。一方、BMP-2 は、それらの液性因子と比較し、心筋肥大作用が少ないことが示唆された。心筋肥大作用が少ないことより、心臓のリモデリングへの影響が少ないと考えられ、心筋保護を目的とした臨床への応用が期待される。

よって、本研究は博士 (医学) の学位授与に値するものと認める。